



PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant:	SAALWAECHTER, Kay et al.) Examiner:
Application No.:	10/617,764) unknown
Filing Date:	July 14, 2003) Art Unit:
For:	SOLID STATE NMR METHOD) unknown
	WITH INVERSE DETECTION)

Atty. Docket No.: P8027US

October 02, 2003

Commissioner for Patents
Alexandria, VA 22313-1450
U.S.A.

TRANSMITTAL LETTER FOR PRIORITY DOCUMENT

Enclosed herewith is a certified copy of a patent application to which a claim for Paris Convention priority has been made in the subject application:

DE 102 33 999.6 filed July 25, 2002

A Return Postcard is also enclosed.

Please also note the following crossed items:

- () Please charge my Deposit Account No. 11-1447 in the amount of US \$ to cover the above fees.
- () A check in the amount of US \$ is enclosed.
- () Applicant believes that this submission is timely and that no petition for an extension of time under 37 CFR 1.136(a) is required. Applicant, however, conditionally petitions for such an extension should same be necessary.
- (X) The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required, or credit any overpayment to Deposit Account No.11-1447.

Respectfully submitted,



Dr. Paul Vincent
Reg. No. 37,461

Kohler Schmid & Partner
Patentanwälte
Ruppmannstrasse 27
D-70565 Stuttgart
Germany
Telephone: 49-711-78 47 30
Fax : 49-711-78 00 996



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 33 999.6

Anmeldetag: 25. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissen-
schaften e.V., München/DE

Bezeichnung: Verfahren der Festkörper-NMR mit inverser Detektion

IPC: G 01 N 24/08

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. Juli 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Asen...

Anmelder:

Stuttgart, den 22.07.2002

P8027 B/P

- 5 Max-Planck-Gesellschaft
zur Förderung der Wissenschaften e.V.
Hofgarten Str. 8
D-80539 München

10 Vertreter:

- Kohler Schmid + Partner
Patentanwälte GbR
Ruppmannstraße 27
15 D-70565 Stuttgart

Verfahren der Festkörper-NMR mit inverser Detektion

20

Die Erfindung betrifft ein Verfahren der Festkörper-Kernspinresonanz (NMR) zur Untersuchung einer Materialprobe, welche sowohl Protonen H als auch Spin-1/2-Heterokerne X enthält, wobei die Materialprobe am magischen Winkel rotiert wird (MAS = magic angle spinning), mit folgenden Schritten:

- 25 a) Erhöhung der Gleichgewichtspolarisation von X;
b) Zerstörung (2) der Protonenmagnetisierung;
c) Transfer der Polarisation von X nach H;
d) Aufnahme der Protonensignale (8) unter der Bedingung einer
Linienverschmälerung;
30 wobei die Schrittfolge a) bis d) mehrmals durchlaufen wird.

Ein solches Verfahren ist durch Y. Ishii, J. P. Yesinowski und R. Tycko, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 2921-2922 bekannt geworden.

Die Kernspinresonanz (NMR = nuclear magnetic resonance)-Spektroskopie ist
 5 in den letzten Jahrzehnten eine der leistungsfähigsten Methoden der
 analytischen Chemie geworden. Elemente mit nicht verschwindendem Kernspin
 können in einem äußeren Magnetfeld zur Präzession ihrer magnetischen
 Momente angeregt werden. Mittels Einstrahlung und Absorption von
 elektromagnetischen Wellen kann die zugehörige Präzessionsfrequenz
 10 (Resonanzfrequenz) bestimmt werden. Diese ist von der Umgebung des
 analysierten Kernes abhängig, so dass aus dieser NMR-Messung
 Informationen über die Bindungspartner der untersuchten Atomkerne und die
 Bindungsabstände zu benachbarten Kernen gewonnen werden können.

15 Zahlreiche besondere Verfahren tragen zu einer Steigerung der Genauigkeit
 von NMR-Messungen bei, zum Beispiel das Rotieren von Festkörperproben am
 magischen Winkel.

Für die exakte Bestimmung von Bindungsabständen zwischen Wasserstoff und
 20 einem in einer Materialprobe reichlich vorhandenem Heterokern mit Kernspin $\frac{1}{2}$
 stellten X. Zhao, J. L. Sudmeier, W. W. Bachovchin und M. H. Levitt, J. Am.
 Chem. Soc. 2001, 123, 11097-11098 ein Bestimmungsverfahren vor. Dieses
 beruht auf heteronuklearer dipolarer Wiedereinkopplung unter Verwendung
 einer $R18_2^5$ -Sequenz. Diese Methode wurde bei ^{15}N - ^1H -Gruppen bei künstlich
 25 angereichertem, d.h. erhöhtem ^{15}N -Gehalt eingesetzt. Sie ist aber ungeeignet
 bei gering konzentrierten Heterokernen, etwa ^{15}N in natürlicher Konzentration in
 einer Materialprobe.

Die Arbeit von Ishii et al. 2001, a.a.O., stellt Untersuchungen an ^{13}C in PMMA-Kunststoffen vor. Das dort angewendete Verfahren beruht auf der indirekten Detektion der ^{13}C -Magnetisierung über das Wasserstoffspektrum. Nach einem Polarisationstransfer von H nach ^{13}C , einer Zerstörung der H-Magnetisierung
 5 mittels zweier Hochfrequenz (HF)-Pulse unter einer Rotationsresonanz-Wiedereinkopplungsbedingung und einem qualitativen Transfer der Polarisation von ^{13}C zurück nach H wurden reine Korrelationsspektren der chemischen Verschiebungen erhalten. Eine präzise Bestimmung von Bindungsabständen ist mit der Methode nach Ishii et al. 2001 nicht möglich.

10

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demgegenüber, ein Verfahren zur präzisen Bestimmung von Bindungsabständen zwischen Protonen und einem Heterokern mit Kernspin $\frac{1}{2}$ bereitzustellen, das auch bei geringer Konzentration der Heterokerne im Verhältnis zu den Protonen gute Ergebnisse liefert und nur
 15 wenige Stunden Messzeit in Anspruch nimmt.

20

Diese Aufgabe wird mit einem NMR-Verfahren der eingangs vorgestellten Art dadurch gelöst, dass in Schritt c) der Transfer der Polarisation von X nach H mit einer Hochfrequenz(=HF)-Impulssequenz erfolgt, die den Transfer unter
 Ausnutzung der Dipolkopplungskonstanten D_{XH} zwischen den Kernen X und den räumlich am nächsten benachbarten Protonen H bewirkt, wobei der
 Transfer nur schwach von Kopplungen von Kernen X zu räumlich weiter entfernten Protonen sowie von Kopplungen der Protonen untereinander
 abhängt, und dass durch Variation eines mit dem Transferprozess physikalisch
 25 eindeutig assoziierten experimentellen Parameters und einer dadurch bewirkten Variation der Intensität der in Schritt d) jeweils aufgenommenen Protonensignale die Dipolkopplungskonstante D_{XH} bestimmt wird.

30

Als inverses Detektionsverfahren hat das erfindungsgemäße Verfahren Zugang zu Elementen mit nur geringem Beitrag zur Kernmagnetisierung der

gesamten Materialprobe, etwa aufgrund geringer Konzentration oder geringem magnetogyrischen Verhältnis. Durch das erfindungsgemäße Verfahren erfolgt der Transfer der Polarisierung von X nach H in einer quantifizierbaren, definierten Weise. Das ermöglicht eine absolute

5 Bestimmung der Bindungsabstände von X und H. Die Auswertung der NMR-Messung kann grundsätzlich auf zwei Wegen erfolgen:

1) Durch geeignete Wahl des experimentellen Parameters spaltet das NMR-Signal in der indirekten Dimension eines 2- oder 3-dimensionalen Spektrums
10 in ein Seitenbandenmuster auf, aus dessen Intensitätsverteilung der Bindungsabstand von X und H berechnet werden kann.

2) Bei einer anderen Wahl des experimentellen Parameters variiert die Intensität eines Resonanzmaximums mit der Inkrementierung, wobei aus
15 dem Intensitätsverlauf der Bindungsabstand berechnet werden kann.

Dazu werden die Messdaten an eine theoretisch abgeleitete Formel angepasst. Im Falle sehr komplexer Formeln kann die Auswertung auch durch Vergleich der Messdaten mit einer einmalig berechneten Muster-Kurve
20 erfolgen, bei der auch die Kalibrierung im Falle von Abweichungen von der idealisierten Theorie, z.B. aufgrund von experimentellen Imperfektionen, berücksichtigt wird.

Bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Verfahrensvariante, bei der das
25 Verhältnis von H-Kernen zu X-Kernen größer oder gleich 10:1 ist, insbesondere größer oder gleich 100:1 ist. Damit ist es möglich, auch nach einer erheblichen Verdünnung oder Abreicherung von X in der Materialprobe NMR-Spektren zu erhalten. Die geringen Anforderungen an die Konzentration des Heterokerns im erfindungsgemäßen Verfahren kommen
30 dann besonders gut zur Geltung.

Eine andere Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens sieht vor, dass die X-Kerne in natürlicher Häufigkeit in der Probe vorliegen. In diesem Fall kann eine Probenpräparation wie etwa Isotopenmarkierung eingespart werden.

- 5 Insbesondere ist eine sinnvolle Messung an einer niedermolekularen Probe mit natürlichem ^{15}N -Gehalt (ca. 0,3% an allem N) erfindungsgemäß ohne weiteres möglich.

- Besonders vorteilhaft ist eine erfindungsgemäße Verfahrensvariante, bei der
 10 die X-Kerne ein magnetogyrisches Verhältnis $\gamma(\text{X}) \leq \gamma(^{13}\text{C})$ aufweisen.
 Aufgrund des Prinzips der indirekten Detektion der Polarisation der X-Kerne kann ein intrinsisch schwaches NMR-Signal aufgrund niedrigen magnetogyrischen Verhältnisses von X umgangen werden.

- 15 Bevorzugt ist auch eine erfindungsgemäße Verfahrensvariante, gemäß der die X-Kerne ^{15}N umfassen. N ist ein wichtiger Baustein der Biochemie, und die Eigenschaften von N-H-Bindungen, insbesondere bei Peptidbindungen, sind von großem Interesse für die Aufklärung von Stoffwechselvorgängen.
 ^{15}N ist ein mit einem Anteil von lediglich 0,3% natürlich vorkommendes
 20 Isotop mit Kernspin $1/2$.

- In einer anderen Verfahrensvariante umfassen die X-Kerne insbesondere ^{13}C . Kohlenstoff ist in allen organischen und biochemischen Verbindungen enthalten, wobei ^{13}C wiederum ein natürliches Kohlenstoffisotop mit Kern-
 25 spin $1/2$ darstellt und in einer Konzentration von etwa 1% enthalten ist. Damit ermöglicht diese Variante Strukturaufklärung in der organischen Chemie.

- Schließlich können erfindungsgemäß die X-Kerne auch ^{29}Si umfassen. Si ist ein Grundbaustein für zahlreiche Kunststoffe wie Silikon und ist auch in der
 30 hochtemperaturfesten Keramik von Bedeutung. Das erfindungsgemäße

Verfahren kann auch auf diesen Gebieten zur Struktur- und Eigenschaftsbestimmung eingesetzt werden.

In einer bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist
5 vorgesehen, dass in Schritt a) ein Polarisationstransfer von H nach X erfolgt.
Dies stellt das Standardvorgehen zur Erhöhung der Polarisation von X über die natürliche Gleichgewichtspolarisation von X hinaus dar.

Eine besonders einfache Verfahrensvariante sieht vor, dass in Schritt a) eine
10 Kreuzpolarisation angewendet wird. Kreuzpolarisation ist eine verbreitete Standardmethode in der NMR zur Übertragung von Polarisation, insbesondere von H nach X.

Vorteilhaft ist auch eine erfindungsgemäße Verfahrensvariante, bei der in
15 Schritt b) ein Feldgradientenimpuls angewendet wird. Dadurch kann die Länge des Phasenzyklus des Experiments reduziert werden, d.h. die Anzahl der Durchläufe der Schrittfolge a) bis d) und damit die Gesamtdauer des Experiments kann verringert werden.

20 Alternativ dazu können in einer Verfahrensvariante in Schritt b) zwei Hochfrequenz-Pulse unter der Bedingung der Rotationsresonanz-Wiedereinkopplung (rotary resonance recoupling condition) angewendet werden. Diese Variante kann ohne eine teure Laborausrüstung zur Erzeugung eines Gradientenfeldes realisiert werden.

25 Bevorzugt wird weiterhin eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei der zwischen den Schritten b) und c) eine Codierung der chemischen Verschiebung der X-Kerne unter Protonenentkopplung während einer Zeit t_1 erfolgt. Dies ist eine bekannte Vorgehensweise im Stand der Technik.

30

Ganz besonders bevorzugt ist eine Verfahrensvariante, die dadurch gekennzeichnet ist, dass in Schritt c) eine TEDOR/REPT-Sequenz angewendet wird, wobei als mit dem Transferprozess physikalisch eindeutig assoziierter experimenteller Parameter das Zeitintervall t_1' zwischen dem
 5 90°-Impuls auf X und dem 90°-Impuls auf H zur Codierung der Dipolkopplungskonstanten D_{XH} verwendet wird. Dies stellt ein besonders robustes Verfahren dar, welches mit vergleichsweise grober Justierung der Messparameter auskommt. Insbesondere können auch die Messergebnisse, aus denen nach Fouriertransformation ein Seitenbandenmuster erhalten
 10 wird, relativ einfach interpretiert werden. Die TEDOR/REPT-Sequenz ist in Figur 1, Bezugszeichen 4 bis 6 dargestellt.

Eine Ausgestaltung der beiden vorgenannten Verfahrensvariante sieht vor, dass die Schrittfolge a) bis d) mehrfach hintereinander ausgeführt wird,
 15 wobei t_1 und t_1' simultan inkrementiert werden, insbesondere mit unterschiedlichen Zeitinkrementen. Durch diese Ausgestaltung wird ein dreidimensionaler Messergebnisraum vermieden. Die Seitenbandenmuster werden in die X-Dimension eingefaltet.

20 Eine Alternative zu der vorherigen Verfahrensvariante ist dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) eine TEDOR/REPT-Sequenz angewendet wird, wobei das Zeitintervall t_1' zwischen dem 90°-Impuls auf X und dem 90°-Impuls auf H fest gewählt wird, und wobei die Anzahl der rotorsynchronisierten 180°-Impulse als mit dem Transferprozess physikalisch
 25 eindeutig assoziierter experimenteller Parameter variiert wird, und dass die Intensitäten aus den gewonnenen Spektren für verschiedene Anzahlen von rotorsynchronisierten 180°-Impulsen zur Bestimmung der Dipolkopplungskonstanten D_{XH} verwendet werden. Bei dieser Variante erfolgt lediglich eine Analyse von Intensitätsvariationen der NMR-Signale. Es ist keine Analyse
 30 von Seitenbandenmustern notwendig. Die Auswertung ist damit

vergleichsweise einfach.

- Eine weitere Alternative zur obigen Verfahrensvariante sieht vor, dass in Schritt c) eine TEDOR/REPT-Sequenz angewendet wird, wobei das
- 5 Zeitintervall t_1' zwischen dem 90° -Impuls auf X und dem 90° -Impuls auf H fest gewählt wird, und wobei ein zeitlicher Abstand zwischen den rotorsynchronisierten 180° -Impulsen auf X relativ zu den rotor-synchronisierten 180° -Impulsen auf H als mit dem Transferprozess physikalisch eindeutig assoziierter experimenteller Parameter variiert wird,
- 10 und dass aus den gewonnenen Spektren für verschiedene zeitliche Abstände die Dipolkopplungskonstanten D_{XH} bestimmt werden. Diese Variante ist ebenfalls sehr robust und störungsunempfindlich und liefert einfach zu interpretierende Ergebnisse.
- 15 Eine Ausgestaltung dieser Verfahrensvariante ist dadurch gekennzeichnet, dass die Schrittfolge a) bis d) mehrfach hintereinander ausgeführt wird, wobei t_1 und der zeitliche Abstand zwischen den rotorsynchronisierten 180° -Impulsen auf X relativ zu den rotorsynchronisierten 180° -Impulsen auf H simultan inkrementiert werden, insbesondere mit unterschiedlichen
- 20 Zeitinkrementen. Durch diese Ausgestaltung wird wiederum ein dreidimensionaler Ergebnisraum vermieden. Auch hier werden Seitenbandenmuster erhalten, die in die X-Dimension eingefaltet sind.

- Eine letzte Alternative zu obiger Verfahrensvariante sieht vor, dass in Schritt
- 25 c) der Transfer durch eine Lee-Goldburg Kreuzpolarisation erfolgt, deren Zeitdauer als mit dem Transferprozess physikalisch eindeutig assoziierter experimenteller Parameter variiert wird. Bei etwas höherem experimentellem Aufwand als bei den zuvor genannten Alternativen können Spektren mit hoher Genauigkeit erhalten werden.

30

In einer vorteilhaften Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in Schritt d) allein ein schnelles Rotieren am magischem Winkel mit einer Rotationsfrequenz größer oder gleich 25 kHz (fast MAS) angewendet. Fast MAS stellt ein sehr einfaches Standardverfahren zur Erhöhung der Messgenauigkeit dar, wobei keine HF-Impulse eingestrahlt werden müssen. Es werden nur geringe Materialprobenmengen verwendet.

Alternativ ist bei einer Verfahrensvariante vorgesehen, in Schritt d) ein langsames Rotieren am magischem Winkel unterstützt von Hochfrequenz-Impulsen anzuwenden. Diese Variante erlaubt die Verwendung von größeren Probenmengen und damit eine Steigerung der Signalintensität.

Eine weitere erfindungsgemäße Verfahrensvariante sieht vor, dass in Schritt d) ein Rotieren am magischem Winkel unterstützt von gepulstem Spin-Lock (pulsed spin locking) angewendet wird. Damit können sehr schmale Linien im Protonenspektrum erreicht werden, wodurch die Messung schneller wird und eine höhere Intensität liefert.

Ganz besonders bevorzugt ist eine Verfahrensvariante, bei der mittels des Verfahrens eine Bestimmung von X-H Bindungsabständen, insbesondere von Wasserstoffbrücken, erfolgt. Die Ermittlung von Bindungsabständen über NMR ist sehr viel billiger als alle Alternativmethoden des Standes der Technik wie etwa Neutronenstreuung.

Ebenso bevorzugt ist eine erfindungsgemäße Verfahrensvariante, bei der mittels des Verfahrens eine Bestimmung einer Struktur einer Peptidkette erfolgt. Aus der Struktur der Peptidkette kann auf die Funktionsweise der Peptidkette (beispielsweise der katalytischen Wirkung eines Enzyms) geschlossen werden, und somit der Ablauf von biochemischen Vorgängen erforscht werden.

Weitere Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung und der Zeichnung. Ebenso können die vorstehend genannten und die noch weiter ausgeführten Merkmale erfindungsgemäß jeweils einzeln für sich oder zu mehreren in beliebigen Kombinationen Verwendung finden. Die gezeigten und beschriebenen Ausführungsformen sind nicht als abschließende Aufzählung zu verstehen, sondern haben vielmehr beispielhaften Charakter für die Schilderung der Erfindung.

- 10 Die Erfindung ist in der Zeichnung dargestellt und wird anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1: eine erfindungsgemäße Pulssequenz für ^1H -detektierte ^{15}N - ^1H Korrelations-NMR-Spektroskopie unter schnellem MAS im Festkörper;

Fig. 2a: ein ^{15}N -Korrelationsspektrum von L-Histidin $\cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, aufgenommen mit einem erfindungsgemäßen Verfahren gemäß Fig. 1 mit dephasierenden HF-Impulsen bei 30kHz MAS;

Fig. 2b: ein Spektrum der gleichen Materialprobe wie in Fig. 2a, aufgenommen mit einem erfindungsgemäßen Verfahren gemäß Fig. 1 mit gepulsten Feldgradienten;

Fig. 2c: drei Schnitte durch das Spektrum von Fig. 2b entlang der ^{15}N -Dimension;

Fig. 2d: reine rotorkodierte Seitenbandenmuster, aufgenommen mit einem erfindungsgemäßen Verfahren bei inkrementiertem t_1' und konstantem $t_1=0$ mit dephasierenden HF- Impulsen.

Die Erfindung wurde experimentell erprobt zur Bestimmung von ^{15}N - ^1H Bindungslängen in natürlicher Häufigkeit mittels inverser Detektion in Festkörper-NMR-Spektroskopie unter schnellem MAS.

5

Es wird ein ^{15}N - ^1H Korrelations-NMR-Experiment für Festkörper vorgestellt, das die Signalempfindlichkeit durch inverse ^1H -Detektion unter schnellem MAS wesentlich steigert und die präzise Bestimmung von NH Bindungslängen über heteronukleare ^1H - ^{15}N Dipol-Dipol-Kopplungen an Proben mit ^{15}N in natürlicher

10

Häufigkeit ermöglicht. Gepulste Feldgradienten oder, alternativ, Hochfrequenzpulse gewährleisten eine ausreichende Unterdrückung unerwünschten ^1H -Signals. Durch diese Methode wird ^{15}N - ^1H -Korrelations-NMR-Spektroskopie in natürlicher Isotopenhäufigkeit routinemäßig anwendbar für Festkörperproben mit Experimentdauern von wenigen Stunden. Die dipolaren Kopplungs-

15

konstanten werden aus Rotationsseitenbandenmustern bestimmt, die durch kürzlich entwickelte Widereinkopplungstechniken in den Spektren entstehen. Die Informationen über $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ chemische Verschiebungen und quantitative ^{15}N - ^1H Kopplungen können in einem "split- t ," Ansatz unmittelbar miteinander kombiniert werden.

20

Sensitivitätssteigerung durch ^1H inverse Detektion ⁽¹⁾ wird heutzutage beinahe universell in heteronuklearen multidimensionalen NMR Experimenten zur Strukturbestimmung von Molekülen in Lösung eingesetzt. Für Festkörper wurde erst kürzlich gezeigt, dass die Steigerung der ^1H -Auflösung unter schnellem

25

Magic-Angle Spinning (MAS) ausreicht, um das Haupthindernis für inverse Detektion in Festkörpern zu überwinden, nämlich die Breite der ^1H -Linien.⁽²⁾ Wesentliche Sensitivitätssteigerungen wurden berichtet für eine Reihe von ^{15}N - und ^{13}C -Systemen.⁽²⁾⁻⁽⁴⁾ Spezifische Pulssequenzen und Detektionsvarianten, die hohe ^1H Auflösung gewähren, ermöglichen ebenfalls große Sensitivitätssteigerungen in invers detektierten statischen ^2H - und ^{15}N -Pulverspektren.^{(5),(6)}

30

Inverse Detektionstechniken sind mit besonderen Herausforderungen verbunden, sobald es gilt, geringe Isotopenkonzentrationen zu beobachten, denn die unvollständige Unterdrückung der großen Überschussmagnetisierung ungekoppelter ^1H -Kerne kann zu schweren Signalartefakten führen. In der NMR an Lösungen sind gepulste Feldgradienten (PFGs) als Technik zur Zerstörung unerwünschter Kohärenzen bekannt.⁽⁷⁾ Für Festkörper wurde gezeigt, dass Radiofrequenz(RF)-Pulse, die starke Dipol-Dipol-Kopplungen ausnutzen, dieselbe Aufgabe erfüllen können, ohne dass spezielle Spektrometerausrüstung vonnöten ist.⁽⁴⁾

10

In dieser Erfindung präsentieren wir zweidimensionale ^{15}N - ^1H Korrelations-NMR-Experimente, die mit inverser ^1H -Detektion unter schnellem MAS an Proben mit ^{15}N in natürlicher Häufigkeit durchgeführt werden. PFGs oder, alternativ, HF-Pulse sorgen für die Unterdrückung von unerwünschtem ^1H -Signal, und die experimentelle Aufnahme von 2D-Spektren ist innerhalb weniger Stunden möglich. Wir zeigen erstmals, dass heteronukleare ^1H - ^{15}N Dipol-Dipol-Kopplungen, und damit Bindungslängen, verlässlich für ^{15}N in natürlicher Häufigkeit aus Rotationsseitenbandenmustern bestimmt werden können, die durch eine kürzlich entwickelte dipolare Wiedereinkopplungstechnik entstehen.⁽⁸⁾ Auf die große Bedeutung von Hochpräzisionsbestimmungen von N-H Bindungslängen durch Festkörper-NMR im Hinblick auf die Charakterisierung von Wasserstoffbrückenbindungen wurde erst neulich hingewiesen.⁽⁹⁾ In unseren ^{15}N - ^1H Spektren kann die Information über (i) chemische Verschiebung und (ii) Dipol-Dipol-Kopplungen/ Bindungslängen entweder unabhängig voneinander oder in kombinierter Form (durch einen "split- t_1 "-Ansatz) gewonnen werden.

25

Die erfindungsgemäße Methode basiert auf der Verbindung zweier Festkörper-NMR Techniken, die zuerst einen inkohärenten, dann einen kohärenten Polarisationstransfer zwischen ^1H und ^{15}N bewerkstelligen (siehe Fig. 1).

30

Anfängliche ^1H -Polarisation wird inkohärent auf ^{15}N durch konventionelle Kreuzpolarisation (CP) transferiert. Danach bereitet man die abschließende (inverse) Detektion des schwachen ^{15}N -Signals auf ^1H vor, indem starke ^1H -Restpolarisation effizient durch einen Feldgradientenpuls (mit 100 μs Länge) oder durch zwei RF-Pulse (mit je 400 μs Länge und unter Rotationsresonanzbedingungen)⁽⁴⁾ entfernt wird, während die ^{15}N -Polarisation in einem longitudinalen Zustand gespeichert bleibt. Beide Dephasierungstechniken waren in ihrer Leistung in der Praxis vergleichbar. Dank dieser Vorselektion kann der gewünschte Kohärenzpfad (d.h. $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow ^1\text{H}$) durch einen vierstufigen Phasenzklus selektiert werden, der zur vollständigen Reinigung des Signals auf insgesamt 16 oder 32 Stufen auszubauen ist. Während HF-Pulse zur Dephasierung unmittelbar mit Standard-NMR-Ausrüstung ausführbar sind, erfordern PFGs den Einbau von Gradientenspulen an Kopf und Boden des MAS-Stators. Schließlich wird das ^{15}N -Signal über einen kohärenten TEDOR-Wiedereinkopplungsschritt^{(8),(10)} zur Detektion zurück auf ^1H transferiert, wodurch die ^{15}N - ^1H -Kopplung messbar wird.

In dieses CP-TEDOR-Transferschema können zwei unabhängige spektrale Dimensionen eingebaut werden: eine dipolar entkoppelte (DD) ^{15}N -Dimension (t_1) zwischen den beiden Transferblöcken, und eine t_1' -Dimension in der Mitte der TEDOR-Sequenz. Während die erstere chemische Verschiebungsinformation über ^{15}N zugänglich macht, führt die letztere zu einer Modulation eines dipolar geordneten Zustands durch die Wiedereinkopplung. Dieses Verfahren der "Rotorkodierung" wurde bereits in anderen homo-⁽¹¹⁾ und heteronuklearen⁽⁸⁾ Korrelationsexperimenten eingeführt. Die Kopplungsinformation kann aus der t_1' -Modulation des detektierten Signals gewonnen werden, die mittels Fouriertransformation in ein Seitenbandenmuster konvertiert wird. Diese Muster hängen empfindlich vom Produkt aus Wiedereinkopplungszeit und Kopplungsstärke ab.⁽⁸⁾

30

Fig. 2a zeigt ein ^{15}N - ^1H Korrelations-NMR-Spektrum von L-Histidin·HCl·H₂O, das in einem 2.5mm Rotorsystem bei 30 kHz MAS aufgenommen wurde. Der Einsatz kleiner Rotoren, der die Technik für Proben mit natürlicher Isotopenhäufigkeit aufgrund der geringen Probenmenge auf kleinere Moleküle
 5 beschränkt, ist leider unausweichlich, da schnelles MAS essentiell für einen effizienten und quantifizierbaren TEDOR-Transfer ist.⁽⁸⁾

Alternativ ist die Verwendung einer Lee-Goldburg Kreuzpolarisation anstelle des TEDOR/REPT-Transfers in Verbindung mit Multipuls-unterstützter ^1H -
 10 Akquisition in t_2 denkbar (siehe Schritt 8), wodurch die Bindungslängenbestimmung auch mit Hilfe von Systemen mit größeren, langsamer rotierenden Rotoren ermöglicht wird.

Nichtsdestoweniger waren nur 8192 Durchläufe der Pulssequenz aus Fig. 1
 15 nötig, um das volle 2D-Spektrum in Fig. 2a aufzunehmen. Um ein reines Korrelationsspektrum der chemischen Verschiebungen zu erhalten, wurde t_1 in Schritten voller Rotorperioden (τ_R) inkrementiert, wobei Rotorkodierung vermieden wird ($t_1' = 0$). In dieser Weise können ^{15}N - ^1H Korrelationsspektren in natürlicher Häufigkeit innerhalb 4-10 Stunden aufgenommen werden, was die
 20 Technik auch für Festkörper routinemäßig einsetzbar macht. Aus dem Vergleich von invers detektiertem CP-TEDOR und dem analogen ^{15}N -detektierten konventionellen 2D TEDOR Experiment resultiert ein Empfindlichkeitserfolg⁽²⁾ von etwa Faktor 6 bis 8.

25 Im Spektrum aus Fig. 2a treten alle drei erwarteten NH Korrelationssignale auf, wenn die ^{15}N - ^1H Kopplungen für eine Dauer von $2 \times 6 \tau_R$ im TEDOR-Schritt wiedereingekoppelt werden. Für kürzere Wiedereinkopplungszeiten ($< 2 \times 4 \tau_R$) verschwindet das Signal der schnell rotierenden NH_3^+ Gruppen aufgrund der schwächeren Kopplung. Eine präzise Messung der Kopplungen ist durch die

Rotationsseitenbandenmuster möglich, die in die Spektren dadurch eingebracht werden, dass t_1' in Schritten von τ_R / N simultan mit t_1 inkrementiert wird ("split- t_1 " Ansatz). Die ganze Zahl N bestimmt die Aufspaltungsweite $\Delta\nu$ der (ungeradzahligen) Seitenbandenordnungen in den Spektren gemäß

- 5 $\Delta\nu = 2\nu_R / N$, worin ν_R die MAS-Frequenz ist; das Spektrum aus Fig. 2b wurde mit $N = 30$ aufgenommen. Im TEDOR-Schritt wurde dipolare Wiedereinkopplung angewendet über eine Dauer von $2 \times 6\tau_R$. Aus den resultierenden Seitenbandenmustern (Fig. 2c) können ^{15}N - ^1H Kopplungen im Bereich $D_{\text{NH}} / 2\pi > 2$ kHz bestimmt werden, was N-H Abständen von bis zu 180 pm
- 10 entspricht. Da das Signal im "split- t_1 "-Experiment über ein Muster verteilt ist, benötigt man 5 bis 10 mal mehr Signalakkumulationen als im reinen Verschiebungs-Korrelationsexperiment.

- Sofern die ^{15}N -Verschiebungsinformation nicht benötigt wird, kann die t_1 -
- 15 Dimension weggelassen und ein rein rotorkodiertes Signal in der t_1' -Dimension aufgenommen werden. Fig. 2d zeigt die Seitenbandenmuster, die für das δ_1 -NH und das ϵ_2 -NH bei ~ 18 ppm bzw. ~ 13 ppm im ^1H -Spektrum beobachtet werden. 20480 Experimentdurchläufe (2,5mal mehr als für das Spektrum in Fig. 2a) wurden insgesamt für die Aufnahme verwendet. Die aus diesen Mustern
- 20 bestimmten N-H Abstände stehen sehr gut mit Resultaten früherer Untersuchungen in Einklang,^{(9),(12)} wie man Tab. 1 entnehmen kann. Abgesehen von der üblichen Überschätzung der Abstände in der NMR,⁽⁹⁾ ist eine weitere systematische Abweichung zu erwarten aufgrund des Einflusses von Kopplungen des ^{15}N zu weiteren Protonen. Nichtsdestotrotz können Abstände
- 25 verlässlich bestimmt werden, selbst wenn die störende Kopplung schon $\sim 30\%$ der Hauptkopplung beträgt.⁽⁸⁾ Man beachte, dass in einem System, in dem viele Protonen mit einem einzelnen ^{15}N -Kern koppeln, die Technik nur Zugang zur dominierenden (stärksten) Kopplung bietet. Zwei oder mehr Kopplungen

ähnlicher Stärke führen zu destruktiven Interferenzen während der Wiedereinkopplung und somit zu Signalverlusten.^{(8),(13)}

Tab. 1. N-H Dipole-Dipol-Kopplungen (D_{NH}) und Abstände (r_{NH}), die mittels NMR
5 Seitenbandenmuster (Fig. 2c und 2d) gemessen wurden. Daten früherer
Messungen mittels Festkörper-NMR und Neutronenstreuung an L-
Histidin·HCl·H₂O sind zum Vergleich aufgeführt.^{(9),(12)}

¹ H Signal	diese Arbeit		NMR	Streuung
	$D_{NH}/2\pi$ [kHz]	r_{NH} [pm]	r_{NH} [pm]	r_{NH} [pm]
~13 ppm (ϵ_2)	(c) 9.4 ± 0.9	109 ± 4	105 ± 5	102.6 ± 0.4
	(d) 9.9 ± 0.5	107 ± 2		
~18 ppm (δ_1)	(c) 8.2 ± 0.9	114 ± 4	109 ± 5	107.0 ± 0.4
	(d) 8.85 ± 0.5	111 ± 2		

Zusammenfassend gesprochen, können wir uns eine weite Anwendungsbreite
10 dieser und verwandter^{(4),(6)} inverser ¹H-Detektionstechniken vorstellen, weil sie
Informationen über dipolare Kopplungen (d.h. Bindungslängen) zusammen mit
der Auflösung chemischer Verschiebungen in Proben mit ¹⁵N in natürlicher
Häufigkeit zugänglich machen. Insbesondere ist diese Technik bedeutsam für
Untersuchungen von N-H...N und N-H...O Wasserstoffbrücken. Im Hinblick auf
15 Biomoleküle wird die Sensitivitätssteigerung für ¹⁵N in Kombination mit der ¹⁵N-
¹H Kopplungsinformation wesentlich helfen, NMR-Experimente zur
Strukturbestimmung von Peptidhauptketten im Festkörper zu verbessern.
Weitere technische Entwicklungen, insbesondere die Optimierung des ¹H HF-
Schwingkreises zu Detektionszwecken, lassen einen weiteren Gewinn an
20 Signalempfindlichkeit erwarten, der die praktische Bedeutung von ¹H-
detektierten Festkörper-NMR-Experimenten weiter steigern wird.

Figur 1 zeigt eine erfindungsgemäße Pulssequenz für ^1H -detektierte ^{15}N - ^1H Korrelations-NMR-Spektroskopie unter schnellem MAS im Festkörper. Nach rechts ist die Zeit aufgetragen; Pulssequenzen auf H, X sowie Gradientenpulse bzgl. der z-Richtung G_z sind auf drei Linien markiert. Schwarze und weiße (unausgefüllte) Balken stehen für 90° bzw. 180° Pulse. Die alternativen Möglichkeiten zur Unterdrückung überschüssiger ^1H -Magnetisierung sind horizontal schraffiert (PFGs) und vertikal schraffiert (dephasierende RF-Pulse) eingezeichnet.

- 10 Im Zeitintervall 1 wird die Kreuzpolarisation mit entsprechenden Sequenzen 1a auf H und X vorgenommen. Anschließend erfolgt die Dephasierung im Zeitintervall 2. Während des Zeitintervalls t_1 , markiert mit Bezugsziffer 3, findet die dipolare Entkopplung 3a und die Kodierung der ^{15}N chemischen Verschiebung statt. Es schließen sich die Zeitintervalle 4, 5 und 6 an, die
15 gemeinsam die TEDOR/ REPT-Sequenz bilden. Im Zeitintervall 4, findet eine erste Wiedereinkopplung statt. Die in eckigen Klammern gesetzten Pulse können dabei in Abständen von einer halben Rotorperiode mehrfach wiederholt werden. Im Zeitintervall t_1' , markiert mit Bezugsziffer 5, findet die Rotorcodierung 5a statt. Es folgt im Zeitintervall 6 eine zweite Wieder-
20 einkopplung; auch hier können die in eckige Klammern gesetzten Pulse wiederholt werden. Zeitintervall 7 markiert einen Dephasierungsschritt, und in Zeitintervall 8 findet die Aufnahme der Protonensignale statt.

- Figur 2a** zeigt ein ^{15}N - ^1H Korrelationsspektrum von L-Histidin·HCl·H₂O,
25 aufgenommen unter 30 kHz MAS in einem 16.4 T Magneten (700 MHz ^1H Larmor- Frequenz) mittels einer Wiedereinkopplungszeit von $2 \times 6 \tau_R$ und durch Signalakkumulation von 8192 Experimentdurchläufen der Pulssequenz aus Fig. 1 (mit RF Dephasierungspulsen und $t_1' = 0$). Nach rechts und oben sind die chemischen Verschiebungen von ^1H und ^{15}N aufgetragen. **Figur 2b** zeigt das

gleiche Spektrum wie in Fig. 2a, aber mit PFG-Dephasierung und dipolaren Rotationsseitenbandenmustern in der ^{15}N -Dimension, aufgenommen durch simultane Inkrementierung von t_1 und t_1' in Schritten von τ_R bzw. $\tau_R/30$. **Figur 2c** zeigt Schnitte durch Fig. 2b entlang der ^{15}N -Dimension bei den entsprechenden ^1H -Positionen. **Figur 2d** zeigt reine rotorkodierte Seitenbandenmuster, aufgenommen durch Inkrementierung von t_1' , während $t_1 = 0$ gesetzt war (mit RF-Dephasierungspulsen). Berechnete Muster sind in den Figuren 2c und 2d jeweils mit feinen, gepunkteten Linien oberhalb der experimentell bestimmten Muster dargestellt. Die N-H Dipol-Dipolkopplungen und N-H Abstände, die aus den Mustern ermittelt wurden, sind in Tab. 1 aufgeführt.

Literaturverzeichnis

- (1) (a) Müller, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4481-4484. (b) Bodenhausen, G.; Ruben, D. J. *Chem. Phys. Lett.*, **1980**, *69*, 185-189. (c) Bax, A.; Griffey, R. R.; Hawkins, B. L. *J. Magn. Reson.* **1983**, *55*, 301-315.
- (2) (a) Ishii, Y.; Tycko, R. *J. Magn. Reson.* **2000**, *142*, 199-204. (b) Schnell, I.; Langer, B.; Söntjens, S. H. M.; van Genderen, M. H. P.; Sijbesma, R. P.; Spiess, H. W. *J. Magn. Reson.* **2001**, *150*, 57-70.
- (3) Goward, G. R.; Schnell, I.; Brown, S. P.; Spiess, H. W.; Kim, H.-D.; Ishida, H. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, S5-S17.
- (4) Ishii, Y.; Yesinowski, J. P.; Tycko, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2921-2922.
- (5) Schmidt-Rohr, K.; Saalwächter, K.; Liu, S.-F.; Hong, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7168-7169.
- (6) Hong, M.; Yamaguchi, S. *J. Magn. Reson.* **2001**, *150*, 43-48.
- (7) Sattler, M.; Schleucher, J.; Griesinger, C. *Progr. NMR Spectr.* **1999**, *34*, 93-158.
- (8) Saalwächter, K.; Graf, R.; Spiess, H. W. *J. Magn. Reson.* **2001**, *148*, 398-418.
- (9) Zhao, X.; Sudmeier, J. L.; Bachovchin, W. W.; Levitt, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11097-11098.
- (10) (a) Morris, G. A.; Freeman, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 760-761. (b) Hing, A. W.; Vega, S.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 205-209.
- (11) (a) Graf, R.; Demco, D. E.; Gottwald, J.; Hafner, S.; Spiess, H. W. *J. Chem. Phys.* **1996**, *106*, 885-895. (b) Brown, S. P.; Schnell, I.; Brand, J. D.; Müllen, K.; Spiess, H. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6712. (c) Brown, S. P.; Zhu, X. X.; Saalwächter, K.; Spiess, H. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4275-4285. (d) Schnell, I.; Spiess, H. W. *J. Magn. Reson.* **2001**, *151*, 153.
- (12) Fuess, H.; Hohlwein, D.; and Mason, S. A. *Acta Cryst.* **1977**, *B33*, 654-659.

- (13) Fyfe, C. A.; Lewis, A. R. *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 48-55.

Patentansprüche

1. Verfahren der Festkörper-Kernspinresonanz (NMR) zur Untersuchung einer Materialprobe, welche sowohl Protonen H als auch Spin-1/2-Heterokerne X enthält, wobei die Materialprobe am magischen Winkel rotiert wird (MAS = magic angle spinning), mit folgenden Schritten:

- a) Erhöhung der Gleichgewichtspolarisation von X;
- b) Zerstörung (2) der Protonenmagnetisierung;
- c) Transfer der Polarisation von X nach H;
- d) Aufnahme der Protonensignale (8) unter der Bedingung einer Linienverschmälerung;

wobei die Schrittfolge a) bis d) mehrmals durchlaufen wird,

dadurch gekennzeichnet,

dass in Schritt c) der Transfer der Polarisation von X nach H mit einer Hochfrequenz(=HF)-Impulssequenz erfolgt, die den Transfer unter Ausnutzung der Dipolkopplungskonstanten D_{XH} zwischen den Kernen X und den räumlich am nächsten benachbarten Protonen H bewirkt, wobei der Transfer nur schwach von Kopplungen von Kernen X zu räumlich weiter entfernten Protonen sowie von Kopplungen der Protonen untereinander abhängt,

und dass durch Variation eines mit dem Transferprozess physikalisch eindeutig assoziierten experimentellen Parameters und einer dadurch bewirkten Variation der Intensität der in Schritt d) jeweils aufgenommenen Protonensignale die Dipolkopplungskonstante D_{XH} bestimmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von H-Kernen zu X-Kernen größer oder gleich 10:1 ist, insbesondere größer gleich 100:1 ist.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die X-Kerne in natürlicher Häufigkeit in der Probe vorliegen.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die X-Kerne ein magnetogyrisches Verhältnis $\gamma(X) \leq \gamma(^{13}\text{C})$ aufweisen.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die X-Kerne ^{15}N umfassen.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die X-Kerne ^{13}C umfassen.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die X-Kerne ^{29}Si umfassen.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt a) ein Polarisationstransfer von H nach X erfolgt.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt a) eine Kreuzpolarisation (1) angewendet wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) ein Feldgradientenimpuls angewendet wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) zwei Hochfrequenz-Pulse unter der Bedingung der Rotationsresonanz-Wiedereinkopplung (rotary resonance recoupling condition) angewendet werden.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den Schritten b) und c) eine Codierung der chemischen Verschiebung der X-Kerne unter Protonenentkopplung (3a) während einer Zeit t_1 (3) erfolgt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) eine TEDOR/REPT-Sequenz (4, 5, 6) angewendet wird, wobei als mit dem Transferprozess physikalisch eindeutig assoziierter experimenteller Parameter das Zeitintervall t_1' (5) zwischen dem 90°-Impuls auf X und dem 90°-Impuls auf H zur Codierung der Dipolkopplungskonstanten D_{XH} verwendet wird.
14. Verfahren nach den Ansprüchen 12 und 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Schrittfolge a) bis d) mehrfach hintereinander ausgeführt wird, wobei t_1 (3) und t_1' (5) simultan inkrementiert werden, insbesondere mit unterschiedlichen Zeitinkrementen.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) eine TEDOR/REPT-Sequenz (4, 5, 6) angewendet wird, wobei das Zeitintervall t_1' (5) zwischen dem 90°-Impuls auf X und dem 90°-Impuls auf H fest gewählt wird, und wobei die Anzahl der rotorsynchronisierten 180°-Impulse als mit dem Transferprozess physikalisch eindeutig assoziierter experimenteller Parameter variiert wird,

und dass die Intensitäten aus den gewonnenen Spektren für verschiedene Anzahlen von rotorsynchronisierten 180° -Impulsen zur Bestimmung der Dipolkopplungskonstanten D_{XH} verwendet werden.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) eine TEDOR/REPT-Sequenz (4, 5, 6) angewendet wird, wobei das Zeitintervall t_1' (5) zwischen dem 90° -Impuls auf X und dem 90° -Impuls auf H fest gewählt wird, und wobei ein zeitlicher Abstand zwischen den rotorsynchronisierten 180° -Impulsen auf X relativ zu den rotorsynchronisierten 180° -Impulsen auf H als mit dem Transferprozess physikalisch eindeutig assoziierter experimenteller Parameter variiert wird, und dass aus den gewonnenen Spektren für verschiedene zeitliche Abstände die Dipolkopplungskonstanten D_{XH} bestimmt werden.
17. Verfahren nach den Ansprüchen 12 und 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Schrittfolge a) bis d) mehrfach hintereinander ausgeführt wird, wobei t_1 (3) und der zeitliche Abstand zwischen den rotorsynchronisierten 180° -Impulsen auf X relativ zu den rotorsynchronisierten 180° -Impulsen auf H simultan inkrementiert werden, insbesondere mit unterschiedlichen Zeitinkrementen.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) der Transfer durch eine Lee-Goldburg Kreuzpolarisation erfolgt, deren Zeitdauer als mit dem Transferprozess physikalisch eindeutig assoziierter experimenteller Parameter variiert wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt d) allein ein schnelles Rotieren am magischem Winkel mit einer Rotationsfrequenz größer oder gleich 25 kHz (fast MAS) angewendet wird.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt d) ein Rotieren am magischem Winkel unterstützt von Hochfrequenz-Impulsen angewendet wird.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt d) ein Rotieren am magischem Winkel unterstützt von gepulstem Spin-Lock (pulsed spin locking) angewendet wird.
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mittels des Verfahrens eine Bestimmung von X-H Bindungsabständen, insbesondere von Wasserstoffbrücken, erfolgt.
23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mittels des Verfahrens eine Bestimmung einer Struktur einer Peptidkette erfolgt.

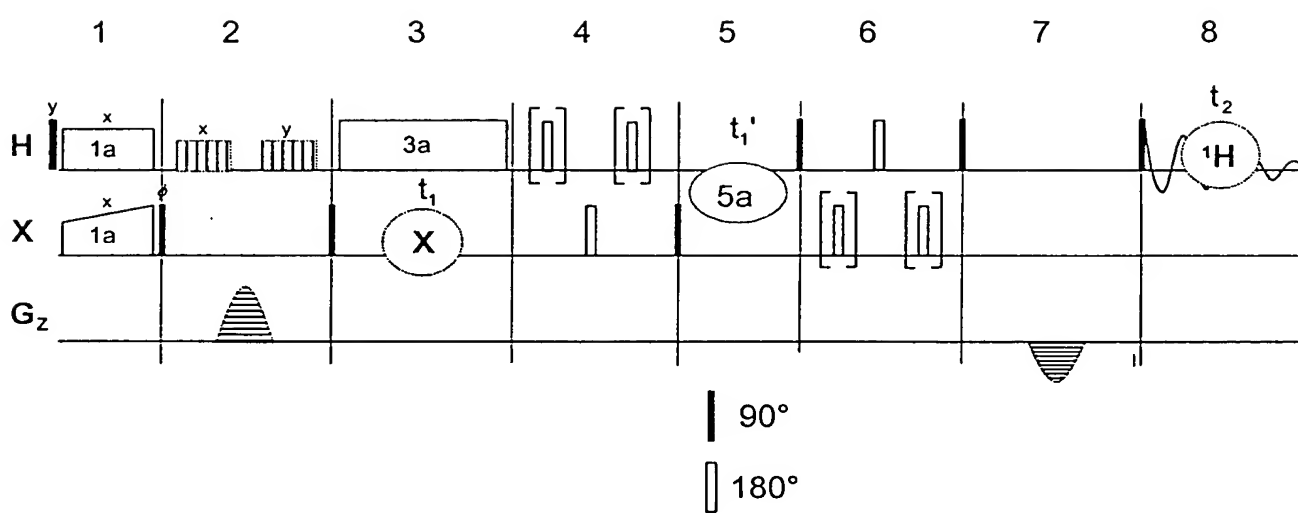


Fig. 1

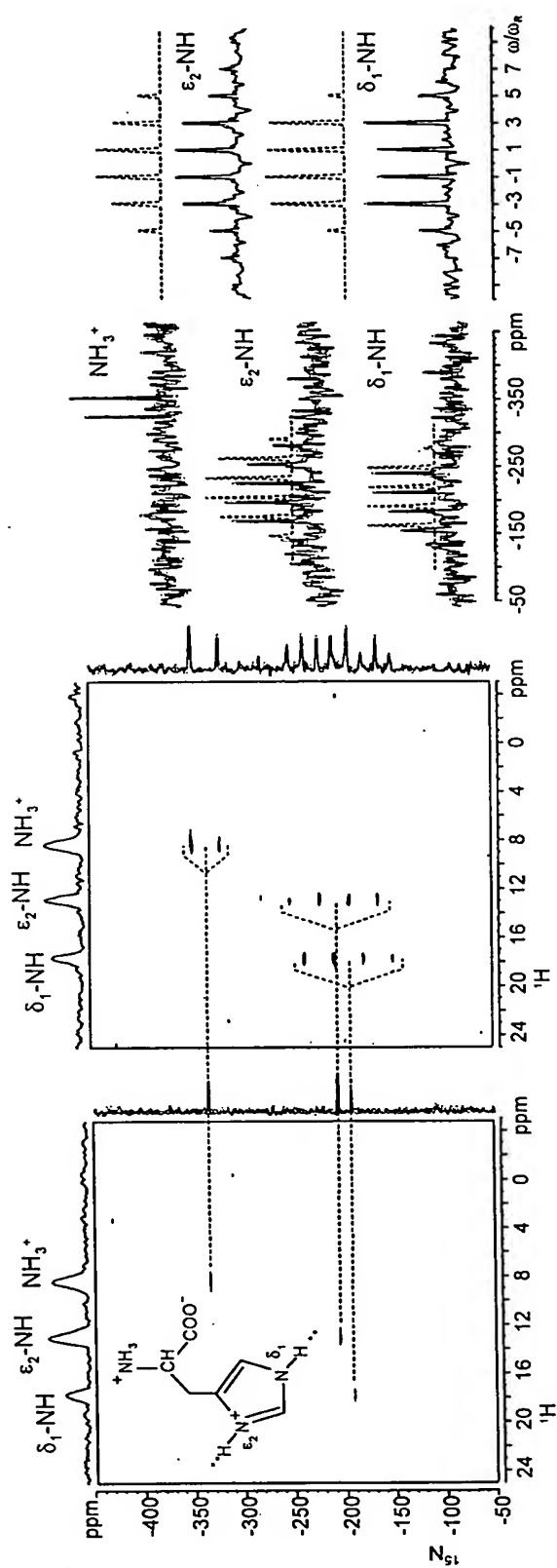


Fig. 2a

Fig. 2b

Fig. 2c

Fig. 2d

Zusammenfassung

Ein Verfahren der Festkörper-Kernspinresonanz (NMR) zur Untersuchung einer Materialprobe, welche sowohl Protonen H als auch Spin-1/2-Heterokerne X enthält, wobei die Materialprobe am magischen Winkel rotiert wird, mit folgenden Schritten:

- a) Erhöhung der Gleichgewichtspolarisation von X;
- b) Zerstörung (2) der Protonenmagnetisierung;
- c) Transfer der Polarisation von X nach H;
- d) Aufnahme der Protonensignale (8) unter der Bedingung einer Linienverschmälerung,

ist dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) der Transfer der Polarisation von X nach H mit einer Hochfrequenz(=HF)-Impulssequenz erfolgt, die den Transfer unter Ausnutzung der Dipolkopplungskonstanten D_{XH} zwischen X und am nächsten benachbarten Protonen H bewirkt, und dass durch Variation eines mit dem Transferprozess assoziierten Parameters die Dipolkopplungskonstante D_{XH} bestimmt wird. Dadurch wird eine präzise Bestimmung des Bindungsabstands X-H auch bei geringer Konzentration von X verglichen mit H ermöglicht.

Fig.1